

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-234371

(43)公開日 平成10年(1998) 9月8日

(51)Int.Cl. ⁵ C 1 2 N 15/09 C 0 7 H 21/04 C 1 2 N 1/21 C 1 2 P 21/02 C 1 2 Q 1/68	識別記号 Z N A	F I C 1 2 N 15/00 C 0 7 H 21/04 C 1 2 N 1/21 C 1 2 P 21/02 C 1 2 Q 1/68	Z N A A B A
審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 15 頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願平9-41146	(71)出願人 000000066	
(22)出願日	平成9年(1997) 2月25日	味の素株式会社	
		東京都中央区京橋1丁目15番1号	
		(72)発明者 木村 英一郎	
		神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素	
		株式会社生産技術研究所内	
		(72)発明者 矢越 知津	
		神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素	
		株式会社生産技術研究所内	
		(72)発明者 大住 剛	
		神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1味の素	
		株式会社生産技術研究所内	
		(74)代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)	
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 新規遺伝子

(57)【要約】

【課題】 コリネ型細菌のビオチン作用抑制物質に対する耐性に関与する遺伝子を提供する。

【解決手段】 下記(A)又は(B)に示す蛋白質をコードするDNA。(A)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。

(B)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、コリネ型細菌に界面活性剤に対する耐性を付与する蛋白質。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記(A)又は(B)に示す蛋白質をコードするDNA。(A)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質。

(B)配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有する蛋白質。

【請求項2】 下記(a)又は(b)に示すDNAである請求項1記載のDNA。

(a)配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号2331～3941からなる塩基配列を含むDNA。

(b)配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号2331～3941からなる塩基配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、コリネ型細菌の新規遺伝子に関し、詳しくは界面活性剤耐性遺伝子に類似した遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、L-リジン及びL-グルタミン酸は、これらのアミノ酸生産能を有するプレバクテリウム属やコリネバクテリウム属に属するコリネ型細菌を用いて発酵法により工業生産されている。この方法では、コリネ型細菌は生育にビオチンを要求する一方、培地中に過剰量のビオチンが存在すると、L-グルタミン酸が蓄積しないことが知られている。従って、従来のL-グルタミン酸の製造法においては、ビオチン濃度を制限した培地で培養するか、あるいはビオチンを充分量含有する培地を用いる場合には、培養の初発または途上でビオチン作用抑制物質として界面活性剤またはラクタム系抗生物質を培地に含有させて培養するかのいずれかの方法が採用されている。しかしながら、特に培地の炭素源として蔗糖蜜等の安価ではあるが過剰量のビオチンを含有する原料を使用する場合、培地に添加することが必要なビオチン作用抑制物質が製造コスト高の原因となっていた。

【0003】これに対し、本発明者らは、コリネバクテリウム属細菌に由来し、該細菌に界面活性剤に対する耐性を付与する蛋白質(DTSR蛋白)をコードする遺伝子(d t s R遺伝子)の存在を突き止め、この遺伝子が破壊されたコリネ型L-グルタミン酸生産菌は、野生株がほとんどL-グルタミン酸を生成しない量のビオチンが存在する条件においても著量のL-グルタミン酸を生成すること、及び、L-リジン生産能を有するコリネ型L-グルタミン酸生産菌は、d t s R遺伝子を増幅すると著量のL-リジンを生産する能力が付与されることを見出している(WO95/23224号国際公開パンフレット)。

【0004】また、本発明者らは、コリネ型L-グルタミン酸生産菌に、ビオチン作用抑制物質に対する温度感受性を付与することにより、ビオチン存在下でも安定してL-グルタミン酸を発酵生産することができること、及び、このようなビオチン作用抑制物質に対する温度感受性株にL-リジン生産性を付与することにより、ビオチン存在下でも、安定してL-リジンとL-グルタミン酸を同時に発酵生産することができることを見出している(WO96/06180号国際公開パンフレット)。

【0005】このような、ビオチン作用抑制物質に対する温度感受性に関与する遺伝子として、上記d t s R遺伝子が挙げられるが、この遺伝子がコードするDTSR蛋白のアミノ酸配列は、当該蛋白質はProc.Nati.Acad.Sci.USA vol.83 (1986) 8049-8053; Proc.Nati.Acad.Sci.USA vol.83 (1986) 4864-4868; Gene vol.122 (1992) 199-202において、プロピオニルコエー(CoA)カルボキシシレース(PCC)蛋白質βサブユニットとして記載されている蛋白質と相同性があることが判明している。プロピオニルコエーカルボキシシレースは、αケトグルタレートと2-ヒドロキシグルタレート、プロピオニルコエー、D-メチルマロニルコエー、L-メチルマロニルコエーを経てスクシニルコエーに変換する代謝経路のうちの1反応を触媒する酵素であり、同代謝経路はTCAサイクルにおいてαケトグルタレートデヒドロゲネースに触媒される反応をバイパスする経路のようである。また、プロピオニルコエーカルボキシシレースはビオチンを補酵素とする酵素である。

【0006】これらのことから、プロピオニルコエーカルボキシシレースが触媒する反応、さらにはこの反応を含む上記代謝経路又はその一部が、界面活性剤耐性に関与していることが示唆される。したがって、界面活性剤耐性に関与する遺伝子には、d t s R遺伝子以外にも、プロピオニルコエーカルボキシシレースαサブユニット、あるいは上記代謝経路の各反応を触媒する他の酵素もしくはそのサブユニットをコードする遺伝子が含まれる可能性が高いと考えられた。また、本発明者らはDTSRタンパク欠損株が培養にオレイン酸を必要とすることを見出しており、ビオチンを補酵素とするアセチルコエーカルボキシシレースがプロピオニルコエーカルボキシシレースに構造が類似していることから、脂肪酸代謝経路の各反応を触媒する酵素もしくはそのサブユニットをコードする遺伝子も、界面活性剤耐性に関与している可能性があると考えられた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記観点からなされたものであり、コリネ型細菌の界面活性剤等のビオチン作用抑制物質に対する耐性に関与する遺伝子を提供することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、d t s R遺

伝子をクローニングしたときに、DTSR蛋白質をコードするORF（オープンリーディングフレーム）のすぐ下流に別のORFが途中まで存在することを見出した。そして、このORF全長を含むクローンを取得することに成功し、このORFがコードする蛋白質がDTSR蛋白質と相同性を有することを見出した。

【0009】すなわち本発明は、下記（A）又は（B）に示す蛋白質をコードするDNAである。

（A）配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質である。

（B）配列表の配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有する蛋白質。

【0010】上記DNAとして具体的には、下記（a）又は（b）に示すDNAが挙げられる。

（a）配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号2331～3941からなる塩基配列を含むDNA。

（b）配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号2331～3941からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【0011】以下、上記のいずれかのDNAを、「本発明の遺伝子」又は「dtsR遺伝子」、これらのDNAがコードする蛋白質を「DTSR2蛋白質」ということがある。

【0012】また、本発明にいうコリネ型細菌とは、バーjeez・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー（Bergey's Manual of Determinative Bacteriology）第8版599頁（1974）に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、孢子形成能を有しない桿菌であり、従来プレバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合されたプレバクテリウム属細菌（Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)）を含み、またコリネバクテリウム属細菌と非常に近縁なプレバクテリウム属細菌及びマイクロバテリウム属細菌を含む。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の遺伝子は、野生型コリネ型細菌の染色体DNAの各種断片を、コリネ型細菌で機能するベクターと連結して各種組換えDNAを作成し、この組換えDNAをコリネ型細菌の界面活性剤感受性変異株に導入して形質転換を行い、形質転換株の中から界面活性剤感受性が失われた株を選択し、界面活性剤感受性が失われた形質転換株より組換えDNAを回収し、ベクターに連結されている野生型コリネ型細菌の染色体DNA断片の構造を解析することによって、dtsR遺伝子のすぐ下流にあるORFとして得られたものである。このように、本発明の遺伝子は、WO95/23224号国際公開パンフレッ

トに記載されているdtsR遺伝子の取得方法と同様にして取得することができる。以下に、コリネ型細菌の界面活性剤感受性変異株を利用して本発明の遺伝子を取得する方法を説明する。

【0014】界面活性剤感受性変異株とは、野生型のコリネ型細菌の生育に影響を与えない濃度の界面活性剤が存在する培地中で生育が悪くなるコリネ型細菌の変異株をいう。例えば界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテートの場合、コリネ型細菌の界面活性剤感受性変異株は0.1～1mg/dlの濃度の上記界面活性剤が培地中に添加されると生育が野生株と比較して悪くなる。一方、野生型のコリネ型細菌は0.1～1mg/dlの濃度の上記界面活性剤が添加された培地中でも生育に大きな変化はみられない。このような界面活性剤感受性変異株としては、具体的には、コリネバクテリウム・グルタミカム AJ11060が挙げられる。同株は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されており、受託番号FERM P-3678が付与されている。

【0015】上記のようなコリネ型細菌の界面活性剤感受性変異株から、例えば斎藤らの方法（H. Saito and K. Miura Biochem. Biophys. Acta 72, 619 (1963)）に従い染色体DNAを回収する。回収した染色体DNAを制限酵素を用いて切断し、コリネ型細菌で機能するベクターに連結し、各種組換えDNAを得る。

【0016】この各種組換えDNAをコリネ型細菌の界面活性剤感受性変異株に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリ K-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法（Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)）があり、パチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法（Duncan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., Gene, 1, 153 (1977)）がある。あるいは、パチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法（Chang, S. and Choen, S. N., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929 (1978)）も応用できる。本発明の実施例で用いた形質転換の方法は、電気パルス法（特開平2-207791号公報参照）である。

【0017】次に、形質転換株を、一旦、界面活性剤を含まないM-CM2G寒天プレート（グルコース5g、ポリペプトン10g、酵母エキス10g、NaCl5g、DL-メチオニン0.2g、寒天15g及びクロラ

ムフェニコール4mgを純水1Lに含む。pH7.2)に塗布して数万個のコロニーを形成させる。当該コロニーを30mg/Lの界面活性剤(Tween40)を含むM-CM2Gプレートにレプリカし、界面活性剤含有M-CM2Gプレート上で良好な生育を示すものを取得することにより、界面活性剤感受性を失った株を取得できる。

【0018】界面活性剤感受性が失われた形質転換株より組換えDNAを、野生型コリネ型細菌の染色体DNAと同様にして調製し、ベクターに連結されている野生型コリネ型細菌の染色体DNA断片の塩基配列を決定する。上記のようにして得られる本発明の遺伝子の例として、プレバクテリウム・ラクトフェーメンタム ATCC13869株から得られるd t s R2遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を、配列表の配列番号1に示す。配列番号1に示す塩基配列において、d t s R2遺伝子は、塩基番号2331~3941に相当する。また、配列番号1に示す塩基配列において、塩基番号359~1987は、d t s R遺伝子のコード配列である。また、d t s R2遺伝子がコードするDTSR2蛋白質のアミノ酸配列を配列番号3に、d t s R遺伝子がコードするDTSR蛋白質のアミノ酸配列を配列番号2に示す。

【0019】尚、本発明の実施例では、上記のようにして得られたDNA断片は、本発明の遺伝子の3'末端側を一部欠いていた。そのため、配列番号4(配列番号1の塩基番号3624~3653に相当する)および配列番号5(配列番号1の塩基番号3721~3750に相当する)に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼチェーンリアクション法(PCR: polymerase chain reaction; White, T. J. et al; Trends Genet. 5, 185(1989)参照)により、プレバクテリウム・ラクトフェーメンタム ATCC13869株から、本発明の遺伝子の3'末端側部分を増幅することによって、この部分を取得し、塩基配列を決定した。

【0020】本発明の遺伝子は、その塩基配列が明らかにされたので、配列番号1に示す塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプローブとするハイブリダイゼーションによってコリネ型細菌の染色体DNAライブラリーから選択することによって取得することができる。また、本発明の遺伝子は、配列番号1に示す塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとするPCRにより、コリネ型細菌の染色体DNAから本発明の遺伝子全長を増幅することによっても取得することができる。なお、d t s R遺伝子を含むプラスミドpDTR6を保持するエシェリヒア・コリJM109/pDTR6(プライベートナンバーAJ12967)株は、1994年2月22日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-14168として寄託され、1995年2月9日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、受託番号FERM B

P-4994が付与されている。この菌株から調製されるpDTR6に含まれるd t s R遺伝子及びその下流の領域は、上記ハイブリダイゼーションのプローブに使用することができる。

【0021】本発明の遺伝子は、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号2331~3941で表される塩基配列を有するDNAの他に、配列番号3に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを含む。また、配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有する蛋白質であっても、コリネ型細菌に界面活性剤に対する耐性を付与する機能を有する限り、そのような蛋白質をコードするDNAは、本発明の遺伝子に含まれる。

【0022】配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAは、例えば、コリネ型細菌の野生株又は変異株から、配列表の配列番号1に示す塩基配列において塩基番号2331~3941で表される塩基配列の少なくとも一部を有するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAを単離することによって、取得され得る。ここでいう「ストリンジントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは温度が完全にマッチしたハイブリッドのTm~(Tm-30)℃、好ましくはTm~(Tm-20)℃の範囲で、かつ1×SSC、好ましくは0.1×SSCに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。なお、配列表の配列番号1に示す塩基配列において塩基番号2331~3941で表される塩基配列とd t s R遺伝子のコード配列とはストリンジントな条件ではハイブリダイズしない。

【0023】また、上記のような変異を有するDTSR2蛋白質をコードするDNAは、部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、不可又は逆位を起こすように塩基配列を改変することによって得られる。また、このような変異を有するd t s R2遺伝子は、従来知られている突然変異処理によっても取得され得る。突然変異処理としては、d t s R2遺伝子を含むDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及びd t s R2遺伝子を含むDNAを保持する微生物を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくは亜硝酸等の通常人工突然変異に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。変異処理した後、変異処理さ

れたDNA又は変異処理された微生物から、これらがコードし又は産生するDTSR2蛋白質がコリネ型細菌に界面活性剤に対する耐性を付与する機能を保持し、かつ、DTSR2蛋白質のアミノ酸配列が変異したものを選択することによって、変異を導入することができる位置、又は変異が生じた位置を決定することができる。導入される変異の位置は、DTSR2蛋白質の機能に実質的に影響のない限り、特に制限されない。また、導入される変異の数は、蛋白質の立体構造における変異されるアミノ酸の位置や種類によっても異なり、DTSR2蛋白質の機能に実質的に影響のない限り、特に制限されないが、通常、1~20個、好ましくは1~10個である。

【0024】dtsR2遺伝子がコードするDSTR蛋白質は、dtsR遺伝子がコードするDTSR蛋白質と相同性が高く、同様の機能を有すると推定される。したがって、dtsR2遺伝子は、dtsR遺伝子と同様に、L-グルタミン酸及びL-リジン等の製造に用いるコリネ型細菌の育種等に利用できることが期待される。

【0025】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に具体的に説明する。

【0026】

【実施例1】 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869 (コリネバクテリウム属細菌の野生株) の染色体DNAの調製
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869をT-Y培地 (Bacto-trypton (Difco) 1%、Bacto-yeast extract (Difco) 0.5%、NaCl 0.5% (pH 7.2)) 100mlに接種し、温度31.5℃で8時間培養し、培養物を得た。この培養物を3,000r.p.m.で15分間、遠心分離処理し湿潤菌体0.5gを得た後、該菌体から斎藤、三浦の方法 (Biochem. Biophys. Acta., 72, 619 (1963)) により染色体DNAを得た。次いで、この染色体DNA 60μg 及び制限酵素 Sau3AI、3ユニットを10mMトリス-塩酸緩衝液 (50mM NaCl、10mM MgSO₄及び1mM ジチオスレイトール含有 (pH 7.4)) におのおの混合し、温度37℃で30分間反応させた。反応終了液を常法により、フェノール抽出処理し、エタノール沈澱処理してSau3AIで消化されたプレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869の染色体DNA断片 50μg を得た。

【0027】

【実施例2】 プラスミドベクターDNAを利用したプレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869の遺伝子ライブラリーの作製
 エシェリヒア・コリとコリネバクテリウム属細菌の双方の菌体内で自律複製可能なプラスミドベクターDNA

(pSAC4) 20μg 及び制限酵素BamHI 200ユニットを50mMトリス-塩酸緩衝液 (100mM NaCl及び10mM硫酸マグネシウム含有 (pH 7.4)) に混合し、温度37℃で2時間反応させて消化液を得、該液を常法によりフェノール抽出及びエタノール沈澱処理した。この後、プラスミドベクター由来のDNAフラグメントが再結合することを防止するため、Molecular Cloning 2nd edition (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pl. 56 (1989)) の方法でバクテリアルアルカリホスファターゼ (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理により、DNA断片の脱リン酸化を行い、常法によりフェノール抽出処理し、更にエタノール沈澱処理を行った。

【0028】 このBamHIで消化されたpSAC4を1μg、実施例1で得られたSau3AIで消化されたプレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869の染色体DNA断片を1μg、及び2ユニットのT4 DNAリガーゼ (宝酒造 (株) 製) を、66mM塩化マグネシウム、10mMジチオスレイトール及び10mM ATPを含有する66mMトリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に添加し、温度16℃で16時間反応し、DNAを連結させた。次いで該DNA混合物で、常法によりエシェリヒア・コリ DH5を形質転換し、これを170μg/mlのクロラムフェニコールを含むL寒天培地上にまき、約20,000個のコロニーを得、遺伝子ライブラリーとした。

【0029】

【実施例3】 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ11060の形質転換

上記で述べた約20,000個のコロニーより、組換えDNAの回収を行なった。回収の方法は上記に示した斎藤、三浦の方法に従った。

【0030】 50のパッチに分けた組換えDNA混合物を電気パルス法を用いた形質転換の常法 (特開平2-207791号公報) に従い、界面活性剤に対する感受性が上昇した変異株AJ11060株に導入した。形質転換体をグルコース添加寒天L培地上に接種し、31.5℃で静置培養を行ない、約20,000個の形質転換体を出現させた。次にこれらの形質転換体を界面活性剤30mg/lを含む同プレートにレプリカし、この中で界面活性剤に対して耐性を示し上記プレート上で生育可能であった株を数株得た。

【0031】 上記で得られた数株からそれぞれ組換えDNAを抽出し、同DNAを用いてAJ11060株を再形質転換した。ここでも界面活性剤に対して耐性を示した株を得た。これらの株の1株が保持していた組換えDNAをpDTR6、他の1株が保持していた組換えDNAをpDTR98と命名した。pDTR6を導入したAJ11060菌は、3g/Lの界面活性剤を添加した液体培地での生育阻害が抑制されていた (WO95/23

10

20

30

40

50

224号国際公開パンフレット参照)。

【0032】

【実施例4】 DNAの調製

上記で得られた組換えDNAを含有するAJ11060/pDTR98から常法に従いプラスミドを調製し、エシェリヒア・コリ JM109に導入した。得られたエシェリヒア・コリ JM109/pDTR98をトリプトン1%、酵母エキス0.5%及びNaCl 0.5%からなる培地20mlに温度37℃で24時間前培養し、得られた培養液20mlを上記と同じ組成の培地1lに接種し、温度37℃で3時間培養したのち、0.2gのクロラムフェニコールを添加し、更に同一温度で20時間培養を行い、培養液を得た。次いで、この培養液を3,000r.p.m.で10分間遠心処理して湿潤菌体2gを得、これを20mlの25%ショ糖を含有する350mMトリスー塩酸緩衝液(pH8.0)に懸濁したのち、更にこれにリゾチム(シグマ社製)10mg、0.25M EDTA溶液(pH8.0)8ml及び20%ドデシル硫酸ナトリウム溶液8mlを各々添加し、温度60℃で30分間保温処理し、溶菌液を得た。この溶菌液に、5M NaCl溶液13mlを添加し、温度4℃で16時間処理した後、15,000r.p.m.で30分間遠心分離した。得られた上清液を、常法によりフェノール抽出処理及びエタノール沈澱処理を行いDNAを沈澱させた。

【0033】この沈澱物を減圧乾燥処理した後、1mM EDTAを含有する10mMトリスー塩酸緩衝液(pH7.5)6mlに溶解し、さらにこれに塩化セシウム6g及びエチジウムブロマイド(19mg/ml)0.2mlを添加し、39,000r.p.m.で42時間超遠心分離機を用いて平衡密度勾配遠心分離処理を行い、DNAを単離した。又更に、n-ブタノールを使用してエチジウムブロマイドを除去した後、1mM EDTAを含有する10mMトリスー塩酸緩衝液(pH7.5)に対して透析を行い純化された組換えDNA pDTR98を約500μgを得た。

【0034】

【実施例5】 クローン化DNAの塩基配列の解析

実施例4で得られた組換えDNA pDTR98を用い、クローン化DNA断片(約4.8kbp)のうち約3.8kbpの塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定は、Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit(アプライドバイオケミカル社製)を用い Sangerの方法に従って行った。その結果、pDTR98が有するクローン化DNA断片は、dtsR遺伝子のコード領域全長を含み、さらにその下流に、DTSR蛋白質と高い相同性を示す蛋白質をコードするORFを含む約1kbpの領域を含んでいた。このクローン化DNA断片の塩基配列は、配列表配列番号1の塩基番号1~3869に相当する。

【0035】上記のORFにはターミネーションコドン

は検出されなかったもので、この領域の下流の領域を、プレバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869株の染色体DNAを鋳型とするPCR法により、増幅することによって取得した。PCRは、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを用いたキット(LA PCR in vitro cloning Kit、宝酒造社製)を用い、プライマーは、配列番号4(配列番号1の塩基番号3624~3653に相当する)および配列番号5(配列番号1の塩基番号3721~3750に相当する)に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを使用して行った。具体的にはプレバクテリウム・ラクトファーマンタムATCC13869株の染色体遺伝子を常法により取得し、このDNAの1μgを制限酵素EcoRIにて完全分解した。次に、このDNAと、上記キットに含まれているEcoRIカセットプライマー、及び配列番号4のプライマーとを用い、94℃、30秒;55℃、2分;72℃、1分からなるサイクルを30回繰り返した。次に、この反応液を100倍に希釈し、その1μlを鋳型として、配列番号5のプライマーとキットに含まれているカセットプライマーC2とを用いて、再びPCR反応を行った。PCR反応は上記と同じサイクルで行った。

【0036】増幅された約1.2kbpのDNA断片の塩基配列を、上記と同様の方法で決定した。このDNA断片は、上記ORFを重複して含み、さらにターミネーションコドンを含んでいた。この遺伝子をdtsR2遺伝子、この遺伝子がコードする蛋白質をDTSR2蛋白質と命名した。

【0037】

【発明の効果】本発明により、新規遺伝子であるdtsR2遺伝子が提供される。この遺伝子は、コリネ型細菌のピオチン作用抑制物質に対する温度感受性に関与する遺伝子であるdtsR遺伝子に高い相同性を有しており、各種アミノ酸の生産等に利用できることが期待される。

【0038】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：4961

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：プレバクテリウム・ラクトファーマンタム

株名：ATCC13869

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：359..1987

特徴を決定した方法：

特徴を表す記号：CDS

* 特徴を決定した方法：

存在位置：2331..3941

*

配列

GATCTTGAA	CTCGACAGTT	TTCACCGTCC	AGTTTGGAGC	GCCTGAGCTT	GCAAGCTCCA	60
GCAAGTCAGC	ATTAGTGGAG	CCTGTCACCTT	TTTCGTAAAT	GACCTGGCCA	AAGTCACCGT	120
TTTGGAGCAA	TTTTTCCTTC	AGGAGCTCAA	CGTTTAGCGG	CTCTCTGGAT	CGTGAAATGT	180
CAACGTTTAT	GGAAGCCAAT	GTAGTGGGGT	CGCGTCGAAA	AGCGCGCTTT	AAGGGCGACA	240
CGCCCCAAAA	GTTTACCTT	TAAAACTAC	CCGCACGCAG	CACGAACCTG	TTCAGTGATG	300
TAAATCACCG	CGGAAATATT	GTGGACGTTA	CCCCCGCCTA	CCGCTACGAT	TTCAAAAC	358
ATG ACC ATT TCC TCA CCT TTG ATT GAC GTC GCC AAC CTT CCA GAC ATC						406
Met Thr Ile Ser Ser Pro Leu Ile Asp Val Ala Asn Leu Pro Asp Ile						
1	5	10	15			
AAC ACC ACT GCC GGC AAG ATC GCC GAC CTT AAG GCT CGC CGC GCG GAA						454
Asn Thr Thr Ala Gly Lys Ile Ala Asp Leu Lys Ala Arg Arg Ala Glu						
20	25	30				
GCC CAT TTC CCC ATG GGT GAA AAG GCA GTA GAG AAG GTC CAC GCT GCT						502
Ala His Phe Pro Met Gly Glu Lys Ala Val Glu Lys Val His Ala Ala						
35	40	45				
GGA CGC CTC ACT GCC CGT GAG CGC TTG GAT TAC TTA CTC GAT GAG GGC						550
Gly Arg Leu Thr Ala Arg Glu Arg Leu Asp Tyr Leu Leu Asp Glu Gly						
50	55	60				
TCC TTC ATC GAG ACC GAT CAG CTG GCT CGC CAC CGC ACC ACC GCT TTC						598
Ser Phe Ile Glu Thr Asp Gln Leu Ala Arg His Arg Thr Thr Ala Phe						
65	70	75	80			
GGC CTG GGC GCT AAG CGT CCT GCA ACC GAC GGC ATC GTG ACC GGC TGG						646
Gly Leu Gly Ala Lys Arg Pro Ala Thr Asp Gly Ile Val Thr Gly Trp						
85	90	95				
GGC ACC ATT GAT GGA CGC GAA GTC TGC ATC TTC TCG CAG GAC GGC ACC						694
Gly Thr Ile Asp Gly Arg Glu Val Cys Ile Phe Ser Gln Asp Gly Thr						
100	105	110				
GTA TTC GGT GGC GCG CTT GGT GAG GTG TAC GGC GAA AAG ATG ATC AAG						742
Val Phe Gly Gly Ala Leu Gly Glu Val Tyr Gly Glu Lys Met Ile Lys						
115	120	125				
ATC ATG GAG CTG GCA ATC GAC ACC GGC CGC CCA TTG ATC GGT CTT TAC						790
Ile Met Glu Leu Ala Ile Asp Thr Gly Arg Pro Leu Ile Gly Leu Tyr						
130	135	140				
GAA GGC GCT GGC GCT CGC ATT CAG GAC GGC GCT GTC TCC CTG GAC TTC						838
Glu Gly Ala Gly Ala Arg Ile Gln Asp Gly Ala Val Ser Leu Asp Phe						
145	150	155	160			
ATT TCC CAG ACC TTC TAC CAA AAC ATT CAG GCT TCT GGC GTT ATC CCA						886
Ile Ser Gln Thr Phe Tyr Gln Asn Ile Gln Ala Ser Gly Val Ile Pro						
165	170	175				
CAG ATC TCC GTC ATC ATG GGC GCA TGT GCA GGT GGC AAC GCT TAC GGC						934
Gln Ile Ser Val Ile Met Gly Ala Cys Ala Gly Gly Asn Ala Tyr Gly						
180	185	190				
CCA GCC CTG ACC GAC TTC GTG GTC ATG GTG GAC AAG ACC TCC AAG ATG						982
Pro Ala Leu Thr Asp Phe Val Val Met Val Asp Lys Thr Ser Lys Met						
195	200	205				
TTC GTT ACC GGC CCA GAC GTG ATC AAG ACC GTC ACC GGC GAG GAA ATC						1030
Phe Val Thr Gly Pro Asp Val Ile Lys Thr Val Thr Gly Glu Glu Ile						

13		14
210	215	220
ACC CAG GAA GAG CTT GGC GGA GCA ACC ACC CAC ATG GTG ACC GCT GGC		1078
Thr Gln Glu Glu Leu Gly Gly Ala Thr Thr His Met Val Thr Ala Gly		
225	230	235
AAC TCC CAC TAC ACC GCT GCG ACC GAT GAG GAA GCA CTG GAT TGG GTA		1126
Asn Ser His Tyr Thr Ala Ala Thr Asp Glu Glu Ala Leu Asp Trp Val		
245	250	255
CAG GAC CTG GTG TCC TTC CTC CCA TCC AAC AAT CGC TCT TAC ACA CCA		1174
Gln Asp Leu Val Ser Phe Leu Pro Ser Asn Asn Arg Ser Tyr Thr Pro		
260	265	270
CTG GAA GAC TTC GAC GAG GAA GAA GGC GGC GTT GAA GAA AAC ATC ACC		1222
Leu Glu Asp Phe Asp Glu Glu Glu Gly Gly Val Glu Glu Asn Ile Thr		
275	280	285
GCT GAC GAT CTG AAG CTC GAC GAG ATC ATC CCA GAT TCC GCG ACC GTT		1270
Ala Asp Asp Leu Lys Leu Asp Glu Ile Ile Pro Asp Ser Ala Thr Val		
290	295	300
CCT TAC GAC GTC CGC GAT GTC ATC GAA TGC CTC ACC GAC GAT GGC GAA		1318
Pro Tyr Asp Val Arg Asp Val Ile Glu Cys Leu Thr Asp Asp Gly Glu		
305	310	315
TAC CTG GAA ATC CAG GCA GAC CGC GCA GAA AAC GTT GTT ATT GCA TTC		1366
Tyr Leu Glu Ile Gln Ala Asp Arg Ala Glu Asn Val Val Ile Ala Phe		
325	330	335
GGC CGC ATC GAA GGC CAG TCC GTT GGA TTT GTT GCC AAC CAG CCA ACC		1414
Gly Arg Ile Glu Gly Gln Ser Val Gly Phe Val Ala Asn Gln Pro Thr		
340	345	350
CAG TTC GCT GGC TGC CTG GAC ATC GAC TCC TCT GAG AAG GCA GCT CGC		1462
Gln Phe Ala Gly Cys Leu Asp Ile Asp Ser Ser Glu Lys Ala Ala Arg		
355	360	365
TTC GTC CGC ACC TGC GAC GCG TTT AAC ATC CCA ATC GTC ATG CTT GTC		1510
Phe Val Arg Thr Cys Asp Ala Phe Asn Ile Pro Ile Val Met Leu Val		
370	375	380
GAC GTC CCC GGC TTC CTT CCA GGC GCA GGC CAG GAG TAT GGT GGC ATC		1558
Asp Val Pro Gly Phe Leu Pro Gly Ala Gly Gln Glu Tyr Gly Gly Ile		
385	390	395
CTG CGT CGT GGC GCA AAG CTG CTC TAC GCA TAC GGC GAA GCA ACC GTT		1606
Leu Arg Arg Gly Ala Lys Leu Leu Tyr Ala Tyr Gly Glu Ala Thr Val		
405	410	415
CCA AAG ATT ACC GTC ACC ATG CGT AAG GCT TAC GGC GGA GCG TAC TGC		1654
Pro Lys Ile Thr Val Thr Met Arg Lys Ala Tyr Gly Gly Ala Tyr Cys		
420	425	430
GTG ATG GGT TCC AAG GGC TTG GGC TCT GAC ATC AAC CTT GCA TGG CCA		1702
Val Met Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ser Asp Ile Asn Leu Ala Trp Pro		
435	440	445
ACC GCA CAG ATC GCC GTC ATG GGC GCT GCT GGC GCA GTC GGA TTC ATC		1750
Thr Ala Gln Ile Ala Val Met Gly Ala Ala Gly Ala Val Gly Phe Ile		
450	455	460
TAC CGC AAG GAG CTC ATG GCA GCT GAT GCC AAG GGC CTC GAT ACC GTA		1798
Tyr Arg Lys Glu Leu Met Ala Ala Asp Ala Lys Gly Leu Asp Thr Val		
465	470	475
GCT CTG GCT AAG TCC TTC GAG CGC GAG TAC GAA GAC CAC ATG CTC AAC		1846

15	16
Ala Leu Ala Lys Ser Phe Glu Arg Glu Tyr Glu Asp His Met Leu Asn	
485 490 495	
CCG TAC CAC GCT GCA GAA CGT GGC CTG ATC GAC GGC GTG ATC CTG CCA	1894
Pro Tyr His Ala Ala Glu Arg Gly Leu Ile Asp Gly Val Ile Leu Pro	
500 505 510	
AGC GAA ACC CGC GGA CAG ATT TCC CGC AAC CTT CGC CTG CTC AAG CAC	1942
Ser Glu Thr Arg Gly Gln Ile Ser Arg Asn Leu Arg Leu Leu Lys His	
515 520 525	
AAG AAC GTC ACT CGC CCT GCT CGC AAG CAC GGC AAC ATG CCA CTG	1987
Lys Asn Val Thr Arg Pro Ala Arg Lys His Gly Asn Met Pro Leu	
530 535 540	
TAAATCGGCG AATCCATAAA GGTCAAAAG AATTCAATAA GGATTCGATA AGGGTTCGAT	2047
AAGGGTTCGA TAAGGGCCGA CTAAATGAT TGGATGTAAG GAAATACCAA TGAAAATTGG	2107
CAACTCTTTA CACCCAATCT TTAAGACATG GGGGTGGCG CTGGGCTAAT ATAACCGGTT	2167
AGCGAAACGA TTAGTCCCTT GTTAGGGGGA TTAACCCCTCG AAGTGGGTCG TATTTGGCG	2227
TTGTATGTT CACACAAGAA CCCTGCACAA CGCCTTCAAA GTACGTCGAC CACGACCAAG	2287
CGCATTATTC ACTCTCACC TTCAGGATTT AGACTAAGAA ACC ATG ACT GCA GCA	2342
Met Thr Ala Ala	
1	
CAG ACC AAA CCT GAC CTC ACC ACC ACG GCT GGA AAG CTG TCC GAT CTT	2390
Gln Thr Lys Pro Asp Leu Thr Thr Thr Ala Gly Lys Leu Ser Asp Leu	
5 10 15 20	
CGC TCC CGT CTT GCA GAA GCT CAA GCT CCA ATG GGC GAA GCA ACT GTA	2438
Arg Ser Arg Leu Ala Glu Ala Gln Ala Pro Met Gly Glu Ala Thr Val	
25 30 35	
GAA AAA GTG CAC GCT GCT GGC AGG AAG ACT GCC CGC GAA CGT ATC GAG	2486
Glu Lys Val His Ala Ala Gly Arg Lys Thr Ala Arg Glu Arg Ile Glu	
40 45 50	
TAT TTG CTC GAT GAG GGC TCT TTC GTA GAG ATC GAT GCT CTT GCT CGT	2534
Tyr Leu Leu Asp Glu Gly Ser Phe Val Glu Ile Asp Ala Leu Ala Arg	
55 60 65	
CAC CGT TCC AAG AAC TTC GGC CTG GAT GCC AAG CGT CCA GCT ACT GAC	2582
His Arg Ser Lys Asn Phe Gly Leu Asp Ala Lys Arg Pro Ala Thr Asp	
70 75 80	
GGT GTT GTG ACT GGT TAC GGC ACC ATC GAT GGC CGT AAG GTC TGT GTG	2630
Gly Val Val Thr Gly Tyr Gly Thr Ile Asp Gly Arg Lys Val Cys Val	
85 90 95 100	
TTC TCC CAG GAC GGC GCT GTA TTC GGT GGC GCT TTG GGT GAA GTT TAT	2678
Phe Ser Gln Asp Gly Ala Val Phe Gly Gly Ala Leu Gly Glu Val Tyr	
105 110 115	
GGT GAA AAG ATC GTT AAG GTT ATG GAT CTT GCG ATC AAG ACC GGT GTG	2726
Gly Glu Lys Ile Val Lys Val Met Asp Leu Ala Ile Lys Thr Gly Val	
120 125 130	
CCT TTG ATC GGA ATC AAT GAG GGT GCT GGT GCG CGT ATC CAG GAA GGT	2774
Pro Leu Ile Gly Ile Asn Glu Gly Ala Gly Ala Arg Ile Gln Glu Gly	
135 140 145	
GTT GTG TCT CTG GGT CTG TAC TCA CAG ATT TTC TAC CGC AAC ACC CAG	2822
Val Val Ser Leu Gly Leu Tyr Ser Gln Ile Phe Tyr Arg Asn Thr Gln	
150 155 160	
CGC TCT GGC GTT ATC CCA CAG ATC TCG TTG ATC ATG GGT GCC TGC GCT	2870

17	18
Ala Ser Gly Val Ile Pro Gln Ile Ser Leu Ile Met Gly Ala Cys Ala	
165	170 175 180
GGT GGT CAC GTG TAC TCC CCT GCT CTG ACT GAC TTC ATC GTC ATG GTG	2918
Gly Gly His Val Tyr Ser Pro Ala Leu Thr Asp Phe Ile Val Met Val	
185 190 195	
GAT CAG ACT TCC AAG ATG TTT ATC ACC GGC CCT GAT GTC ATC AAG ACT	2966
Asp Gln Thr Ser Lys Met Phe Ile Thr Gly Pro Asp Val Ile Lys Thr	
200 205 210	
GTC ACC GGT GAA GAT GTC ACC CAG GAA GAG CTC GGT GGT GCG CAC ACC	3014
Val Thr Gly Glu Asp Val Thr Gln Glu Glu Leu Gly Gly Ala His Thr	
215 220 225	
CAC ATG GCT ACC TCC GGT ACC TCC CAT TAC TCT GCG TCT GAT GAT TCA	3062
His Met Ala Thr Ser Gly Thr Ser His Tyr Ser Ala Ser Asp Asp Ser	
230 235 240	
GAT GCT TTG GAT TGG GTT CGC GAG CTG ACC TCT TAT CTT CCA TCC AAC	3110
Asp Ala Leu Asp Trp Val Arg Glu Leu Thr Ser Tyr Leu Pro Ser Asn	
245 250 255 260	
AAC CGT GCG GAA ACT CCT CGC CAG GAG GCC GAC ATC ATG ATC GGT TCC	3158
Asn Arg Ala Glu Thr Pro Arg Gln Glu Ala Asp Ile Met Ile Gly Ser	
265 270 275	
ATC CAG GAA AAC ATC AAC GAT GTG GAT CTG GAA TTG GAC ACC ATC ATC	3206
Ile Gln Glu Asn Ile Asn Asp Val Asp Leu Glu Leu Asp Thr Ile Ile	
280 285 290	
CCG GAT TCC CCG AAC CAG CCT TAT GAC ATG AAG GAA GTT ATT TCC CGC	3254
Pro Asp Ser Pro Asn Gln Pro Tyr Asp Met Lys Glu Val Ile Ser Arg	
295 300 305	
ATC GTC GAC GAC GCC GAG TTC TTC GAG ATC CAG GAA GAC TAC GCA GAG	3302
Ile Val Asp Asp Ala Glu Phe Phe Glu Ile Gln Glu Asp Tyr Ala Glu	
310 315 320	
AAC ATC CTG TGT GGC TTC GCT CGC GTT GAG GGC CGT TCT GTT GGC ATC	3350
Asn Ile Leu Cys Gly Phe Ala Arg Val Glu Gly Arg Ser Val Gly Ile	
325 330 335 340	
GTG GCT AAC CAG CCA ACC CAG TTC GCT GGC TGC TTG GAT ATT AAG GCA	3398
Val Ala Asn Gln Pro Thr Gln Phe Ala Gly Cys Leu Asp Ile Lys Ala	
345 350 355	
TCT GAG AAG GCT GCC CGT TTC ATC CGC ACC TGC GAT GCG TTC AAC ATC	3446
Ser Glu Lys Ala Ala Arg Phe Ile Arg Thr Cys Asp Ala Phe Asn Ile	
360 365 370	
CCA ATC CTT GAG TTC GTG GAC GTT CCA GGC TTC CTG CCT GGC ACC AAC	3494
Pro Ile Leu Glu Phe Val Asp Val Pro Gly Phe Leu Pro Gly Thr Asn	
375 380 385	
CAG GAA TTC GAC GGC ATC ATC CGC CGC GGC GCA AAG CTG CTT TAC GCT	3542
Gln Glu Phe Asp Gly Ile Ile Arg Arg Gly Ala Lys Leu Leu Tyr Ala	
390 395 400	
TAC GCT GAA GCA ACC GTC GGC AAG ATC ACC GTC ATC ACC CGC AAG TCC	3590
Tyr Ala Glu Ala Thr Val Gly Lys Ile Thr Val Ile Thr Arg Lys Ser	
405 410 415 420	
TAC GGC GGA GCG TAC TGC GTG ATG GGT TCC AAG GAT ATG GGC GCT GAC	3638
Tyr Gly Gly Ala Tyr Cys Val Met Gly Ser Lys Asp Met Gly Ala Asp	
425 430 435	

19	20	
CTC GTA TTC GCT TGG CCT ACC GCA CAG ATC GCC GTC ATG GGC GCT TCA	3686	
Leu Val Phe Ala Trp Pro Thr Ala Gln Ile Ala Val Met Gly Ala Ser		
440 445 450		
GGT GCT GTT GGA TTT ATC TAC CGT AAG GAA CTC AAG CAG GCT GCC ACC	3734	
Gly Ala Val Gly Phe Ile Tyr Arg Lys Glu Leu Lys Gln Ala Ala Thr		
455 460 465		
GAA GGC AAG GAC GTT GCT GAG GTC ATG AAG GGC TAC GAG CAG GAG TAC	3782	
Glu Gly Lys Asp Val Ala Glu Val Met Lys Gly Tyr Glu Gln Glu Tyr		
470 475 480		
GAA GAA ACT CTG GTC AAC CCT TAT GTC GCA GCT GAG CGT GGC CTG GTT	3830	
Glu Glu Thr Leu Val Asn Pro Tyr Val Ala Ala Glu Arg Gly Leu Val		
485 490 495 500		
GAC GCC GTT ATC CCA CCT TCT GAG ACC CGC GGC CAG ATC ATT GAG GGT	3878	
Asp Ala Val Ile Pro Pro Ser Glu Thr Arg Gly Gln Ile Ile Glu Gly		
505 510 515		
CTG CGT CTG CTG GAT CGC AAG GTG GTC AAT GTT CCT GCT AAA AAG CAC	3926	
Leu Arg Leu Leu Asp Arg Lys Val Val Asn Val Pro Ala Lys Lys His		
520 525 530		
GGT AAC ATT CCA CTA TAGAACTGT TTTTAAAGG AGAACCATGT CTGAAGAAAT	3981	
Gly Asn Ile Pro Leu		
535		
CACTCAGGAC ACCAAGGCTG CAGAGAAGCC TTTTCTGCAG ATCGTATCTG GCAACCCAAC	4041	
CGATCAAGAG GTTGCTGCCT TGACCGTGGT GTTCGCTGGT TTGGCTAAAG CTGCCGCTGC	4101	
ACAGCAGATG GTGTGGCAA GCAAGGACCG CAACAACCTGG GGCAACCTGG ATGAGCGTCT	4161	
GTCTCGCCCG AACACGTTTA ACCCCAGCGC GTTTCAGAAT GTGAATTTCT TCTAGTTGCA	4221	
TGCAGATCGT TCTCGCTTCG CAGTCCCGT CCGCCGAAA AATCCTCAAT TCGGCGGGCG	4281	
TCGAGCCTCT CATCCACCCA GCTGATGTTG ATGAGGACGC GCTCCTTCAC TCCCTCAACG	4341	
GCTCTGCGCC GGAGGAGATC GTCCGCCAGC TTGCGCTGGC TAAAGCACAG GTGGTTGCGC	4401	
CGTCCTATCC AGGCGACGTC GTCATCGGTG GCGATTCCAT GCTGCTTATC GACGCCACCC	4461	
TCCAAGGCAA GCGCCACACC CGCGAAGCCA CCATCGAAAG ATGGAAACAA CAACGCGGCA	4521	
ACAAGGCCAC ACTGATCACC GGCCATGCCA TCATCTTTGG CGATGAAGTG ATCGTGGAGT	4581	
CCTCCTCCAC CAACATTCAT TTCGCTGAGG CCAGCGATGT GGATATTGAG AGATACGCCG	4641	
ACTCCGGCGA ACCCTTAGAG TGCGCAGGCG CGTTCACCCT CGAAGCACTT GGTGTTGGT	4701	
TCATCGATTC CATCGAAGGC GACCCCTCAT CCGTGATCGG ATTGTCTCTC CCCGTCGTGC	4761	
GCGTGCTTT GTACCGCTC GGTTCACCG CCAGCGACTT CTGGAACATG TAAACACTTT	4821	
CCGCACAAGA CAGGCGTTGC CAAGATTTTC GATTCGTGCA GAGTTTTGGC ACGCCTGTCT	4881	
GGTCTGTCTC GAGTCCCCCA CCAAACCACA GTGCCACCA ACGATGAATT CTCTCCCTAT	4941	
AGTGAGTCGT ATTACGCGTT	4961	

【0039】配列番号：2

配列の長さ：543

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

40 配列の種類：タンパク質

*

配列

Met Thr Ile Ser Ser Pro Leu Ile Asp Val Ala Asn Leu Pro Asp Ile	
1 5 10 15	
Asn Thr Thr Ala Gly Lys Ile Ala Asp Leu Lys Ala Arg Arg Ala Glu	
20 25 30	
Ala His Phe Pro Met Gly Glu Lys Ala Val Glu Lys Val His Ala Ala	
35 40 45	
Gly Arg Leu Thr Ala Arg Glu Arg Leu Asp Tyr Leu Leu Asp Glu Gly	
50 55 60	

21	22
Ser Phe Ile Glu Thr Asp Gln Leu Ala Arg His Arg Thr Thr Ala Phe	
65	80
Gly Leu Gly Ala Lys Arg Pro Ala Thr Asp Gly Ile Val Thr Gly Trp	
85	95
Gly Thr Ile Asp Gly Arg Glu Val Cys Ile Phe Ser Gln Asp Gly Thr	
100	110
Val Phe Gly Gly Ala Leu Gly Glu Val Tyr Gly Glu Lys Met Ile Lys	
115	125
Ile Met Glu Leu Ala Ile Asp Thr Gly Arg Pro Leu Ile Gly Leu Tyr	
130	140
Glu Gly Ala Gly Ala Arg Ile Gln Asp Gly Ala Val Ser Leu Asp Phe	
145	160
Ile Ser Gln Thr Phe Tyr Gln Asn Ile Gln Ala Ser Gly Val Ile Pro	
165	175
Gln Ile Ser Val Ile Met Gly Ala Cys Ala Gly Gly Asn Ala Tyr Gly	
180	190
Pro Ala Leu Thr Asp Phe Val Val Met Val Asp Lys Thr Ser Lys Met	
195	205
Phe Val Thr Gly Pro Asp Val Ile Lys Thr Val Thr Gly Glu Glu Ile	
210	220
Thr Gln Glu Glu Leu Gly Gly Ala Thr Thr His Met Val Thr Ala Gly	
225	240
Asn Ser His Tyr Thr Ala Ala Thr Asp Glu Glu Ala Leu Asp Trp Val	
245	255
Gln Asp Leu Val Ser Phe Leu Pro Ser Asn Asn Arg Ser Tyr Thr Pro	
260	270
Leu Glu Asp Phe Asp Glu Glu Glu Gly Gly Val Glu Glu Asn Ile Thr	
275	285
Ala Asp Asp Leu Lys Leu Asp Glu Ile Ile Pro Asp Ser Ala Thr Val	
290	300
Pro Tyr Asp Val Arg Asp Val Ile Glu Cys Leu Thr Asp Asp Gly Glu	
305	320
Tyr Leu Glu Ile Gln Ala Asp Arg Ala Glu Asn Val Val Ile Ala Phe	
325	335
Gly Arg Ile Glu Gly Gln Ser Val Gly Phe Val Ala Asn Gln Pro Thr	
340	350
Gln Phe Ala Gly Cys Leu Asp Ile Asp Ser Ser Glu Lys Ala Ala Arg	
355	365
Phe Val Arg Thr Cys Asp Ala Phe Asn Ile Pro Ile Val Met Leu Val	
370	380
Asp Val Pro Gly Phe Leu Pro Gly Ala Gly Gln Glu Tyr Gly Gly Ile	
385	400
Leu Arg Arg Gly Ala Lys Leu Leu Tyr Ala Tyr Gly Glu Ala Thr Val	
405	415
Pro Lys Ile Thr Val Thr Met Arg Lys Ala Tyr Gly Gly Ala Tyr Cys	
420	430
Val Met Gly Ser Lys Gly Leu Gly Ser Asp Ile Asn Leu Ala Trp Pro	
435	445
Thr Ala Gln Ile Ala Val Met Gly Ala Ala Gly Ala Val Gly Phe Ile	
450	460

23 24
 Tyr Arg Lys Glu Leu Met Ala Ala Asp Ala Lys Gly Leu Asp Thr Val
 465 470 475 480
 Ala Leu Ala Lys Ser Phe Glu Arg Glu Tyr Glu Asp His Met Leu Asn
 485 490 495
 Pro Tyr His Ala Ala Glu Arg Gly Leu Ile Asp Gly Val Ile Leu Pro
 500 505 510
 Ser Glu Thr Arg Gly Gln Ile Ser Arg Asn Leu Arg Leu Leu Lys His
 515 520 525
 Lys Asn Val Thr Arg Pro Ala Arg Lys His Gly Asn Met Pro Leu
 530 535 540

【0040】配列番号：3

* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：537

配列の種類：タンパク質

配列の型：アミノ酸

*

配列

Met Thr Ala Ala Gln Thr Lys Pro Asp Leu Thr Thr Thr Ala Gly Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Asp Leu Arg Ser Arg Leu Ala Glu Ala Gln Ala Pro Met Gly
 20 25 30
 Glu Ala Thr Val Glu Lys Val His Ala Ala Gly Arg Lys Thr Ala Arg
 35 40 45
 Glu Arg Ile Glu Tyr Leu Leu Asp Glu Gly Ser Phe Val Glu Ile Asp
 50 55 60
 Ala Leu Ala Arg His Arg Ser Lys Asn Phe Gly Leu Asp Ala Lys Arg
 65 70 75 80
 Pro Ala Thr Asp Gly Val Val Thr Gly Tyr Gly Thr Ile Asp Gly Arg
 85 90 95
 Lys Val Cys Val Phe Ser Gln Asp Gly Ala Val Phe Gly Gly Ala Leu
 100 105 110
 Gly Glu Val Tyr Gly Glu Lys Ile Val Lys Val Met Asp Leu Ala Ile
 115 120 125
 Lys Thr Gly Val Pro Leu Ile Gly Ile Asn Glu Gly Ala Gly Ala Arg
 130 135 140
 Ile Gln Glu Gly Val Val Ser Leu Gly Leu Tyr Ser Gln Ile Phe Tyr
 145 150 155 160
 Arg Asn Thr Gln Ala Ser Gly Val Ile Pro Gln Ile Ser Leu Ile Met
 165 170 175
 Gly Ala Cys Ala Gly Gly His Val Tyr Ser Pro Ala Leu Thr Asp Phe
 180 185 190
 Ile Val Met Val Asp Gln Thr Ser Lys Met Phe Ile Thr Gly Pro Asp
 195 200 205
 Val Ile Lys Thr Val Thr Gly Glu Asp Val Thr Gln Glu Glu Leu Gly
 210 215 220
 Gly Ala His Thr His Met Ala Thr Ser Gly Thr Ser His Tyr Ser Ala
 225 230 235 240
 Ser Asp Asp Ser Asp Ala Leu Asp Trp Val Arg Glu Leu Thr Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Pro Ser Asn Asn Arg Ala Glu Thr Pro Arg Gln Glu Ala Asp Ile
 260 265 270
 Met Ile Gly Ser Ile Gln Glu Asn Ile Asn Asp Val Asp Leu Glu Leu
 275 280 50 285

25 26
 Asp Thr Ile Ile Pro Asp Ser Pro Asn Gln Pro Tyr Asp Met Lys Glu
 290 295 300
 Val Ile Ser Arg Ile Val Asp Asp Ala Glu Phe Phe Glu Ile Gln Glu
 305 310 315 320
 Asp Tyr Ala Glu Asn Ile Leu Cys Gly Phe Ala Arg Val Glu Gly Arg
 325 330 335
 Ser Val Gly Ile Val Ala Asn Gln Pro Thr Gln Phe Ala Gly Cys Leu
 340 345 350
 Asp Ile Lys Ala Ser Glu Lys Ala Ala Arg Phe Ile Arg Thr Cys Asp
 355 360 365
 Ala Phe Asn Ile Pro Ile Leu Glu Phe Val Asp Val Pro Gly Phe Leu
 370 375 380
 Pro Gly Thr Asn Gln Glu Phe Asp Gly Ile Ile Arg Arg Gly Ala Lys
 385 390 395 400
 Leu Leu Tyr Ala Tyr Ala Glu Ala Thr Val Gly Lys Ile Thr Val Ile
 405 410 415
 Thr Arg Lys Ser Tyr Gly Gly Ala Tyr Cys Val Met Gly Ser Lys Asp
 420 425 430
 Met Gly Ala Asp Leu Val Phe Ala Trp Pro Thr Ala Gln Ile Ala Val
 435 440 445
 Met Gly Ala Ser Gly Ala Val Gly Phe Ile Tyr Arg Lys Glu Leu Lys
 450 455 460
 Gln Ala Ala Thr Glu Gly Lys Asp Val Ala Glu Val Met Lys Gly Tyr
 465 470 475 480
 Glu Gln Glu Tyr Glu Glu Thr Leu Val Asn Pro Tyr Val Ala Ala Glu
 485 490 495
 Arg Gly Leu Val Asp Ala Val Ile Pro Pro Ser Glu Thr Arg Gly Gln
 500 505 510
 Ile Ile Glu Gly Leu Arg Leu Leu Asp Arg Lys Val Val Asn Val Pro
 515 520 525
 Ala Lys Lys His Gly Asn Ile Pro Leu
 530 535

【0041】配列番号：4

配列の長さ：30

配列の型：核酸

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATATGGGCG CTGACCTCGT ATTCGCTTGG

30

【0042】配列番号：5

配列の長さ：30

配列の型：核酸

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※40 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGCAGGCTGC CACCGAAGGC AAGGACGTTG

30

フロントページの続き

(51) Int. Cl. *

識別記号

F I

// (C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:19)

(72)発明者 中松 亘
神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素
株式会社生産技術研究所内